Simplexa™ BKV

REF MOL2300
Rev. E

Un ensayo de PCR en tiempo real para la cuantificación *in vitro* del virus BK (VBK).

Para uso diagnóstico *in vitro*

INDICACIONES DE USO

El ensayo Simplexa BKV de Focus Diagnostics está diseñado para la cuantificación *in vitro* de los ácidos nucleicos del virus BK (VBK) en muestras de orina y/o plasma utilizando el 3M Integrated Cycler.

Este ensayo está diseñado para ser utilizado en el tratamiento clínico de los pacientes infectados con el VBK, junto con la presentación clínica y otros marcadores de laboratorio que evalúan el progreso de la enfermedad.

Este ensayo no está diseñado como un reactivo de selección de donantes. El ensayo es para uso profesional solamente.

RESUMEN Y EXPLICACIÓN

El virus BK (VBK) de tipo poliomavirus humano, es un virus sin envuelta con un genoma de ADN de doble cadena circular de 5.300 pb. Al principio el VBK fue reconocido como un miembro de la familia de los poliomavirus en 1971, después de de aislarlo de la orina de un receptor de trasplante renal. La tasa de seroprevalencia a nivel mundial es del 70% al 90%[1] en adultos. La seroconversión normalmente se produce durante la infancia a los 4 años[2-7]. La viremia en una primoinfección infecta el riñón, en el que el virus se establece como una infección clínicamente latente[8]. Normalmente el virus permanece durmiente pero puede producirse una reactivación intermitente en determinadas poblaciones, como pacientes inmunodeprimidos o mujeres embarazadas. La reactivación puede derivar en varias manifestaciones, que van desde una viremia subclínica o viruria, hasta la nefropatía y estenosis uretral observada en pacientes trasplantados. La enfermedad clínicamente manifiesta de una infección por VBK no es común, pero se correlaciona con el grado de inmunodepresión.

En la actualidad, además de la PCR, no existen otros métodos fiables de detección y cuantificación del VBK. El cultivo viral pocas veces sirve de ayuda a la hora de proporcionar información oportuna para el tratamiento del paciente debido a su baja tasa de crecimiento y a la necesidad de líneas celulares especializadas[9]. Las pruebas serológicas son de uso mínimo porque la mayoría de la población es seropositiva a una enfermedad relacionada con el VBK, como resultado de la reactivación de una infección latente[10].

PRINCIPIOS DEL PROTOCOLO

El ensayo es un sistema de amplificación y detección de PCR en tiempo real que utiliza un cebador-sonda fluorescente bifuncional para la detección del ADN del VBK en muestras de orina y plasma. La prueba se compone de dos pasos principales: (1) Extracción del ADN de las muestras del paciente, (2) Empleo de un cebador-sonda fluorescente bifuncional junto con un cebador inverso para amplificar una diana específica (para cada analito y control interno). El ensayo proporciona un resultado; una región altamente conservada del gen VP2 del genoma del VBK es la diana para identificar el ADN viral en la muestra. Por último, a fin de monitorizar el proceso de extracción y detectar la inhibición de la PCR se emplea un control interno. La señal de amplificación que se obtiene por cada muestra, se compara con una curva de calibración y se cuantifica.

MATERIALES SUMINISTRADOS

El kit de Focus Diagnostics Simplexa™ para VBK contiene una cantidad suficiente de reactivos para un total de 100 reacciones.

Descripción del Kit

Nombre del compuesto	REF	SÍMBOLO CE EN ETIQUETA		Nombre Abreviado	Color del tapón	Número de viales	Reacciones por vial/kit	Volumen por vial
Simplexa™ BKV Primer Mix	**MOL2301**	**REAG**	**A**	**PM**	Marrón	2	50/100	50 µl
Simplexa™ Master Mix	**MOL2000**	**REAG**	**B**	**MM**	Verde	2	50/100	200 µl
Simplexa Extraction & Amplification Control DNA	**MOL9001**	**CONTROL**	**IC**	**IC**	Azul	3	50/150	250 µl
Simplexa™ BKV Low Positive Control	**MOL2302**	**CONTROL**	**+**	**LPC**	Blanco	6	1/6	200 µl
Simplexa™ BKV High Positive Control	**MOL2303**	**CONTROL**	**++**	**HPC**	Rojo	6	1/6	200 µl

Descripción del componente

<table>
<tr><th>Componente del kit</th><th>Descripción</th></tr>
<tr><td>Simplexa™ BKV Primer Mix (PM) (Mezcla de cebadores)</td><td>Cebadores específicos marcados con colorante fluorescente para la detección y cuantificación de VBK y para el control interno.
<table>
<tr><th>Diana</th><th>Sonda Fluoróforo (colorante)</th><th>Excitación</th><th>Emisión</th><th>Gen diana</th></tr>
<tr><td>BKV</td><td>FAM</td><td>495 nm</td><td>520 nm</td><td>Gen VP2</td></tr>
<tr><td>Control interno</td><td>Q670</td><td>644 nm</td><td>670 nm</td><td>gen A. thaliana</td></tr>
</table></td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Master Mix (MM) (Mezcla maestra)</td><td>ADN polimerasa, tampón y dNTPs</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ Extraction & Amplification Control DNA (IC) (Control de extracción y amplificación de ADN (IC))</td><td>Un fragmento de ADN de 577 pares de bases derivado del gen que codifica la unidad N-metiltransferasa grande de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa de la planta Arabidopsis thaliana.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ BKV Low Positive Control (LPC) (Control positivo bajo)</td><td>Amplicón de VBK en una base de matriz extracelular humana.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ BKV High Positive Control (HPC) (Control positivo alto)</td><td>Amplicón de VBK en una base de matriz extracelular humana.</td></tr>
<tr><td>Simplexa™ BKV Barcode Card (Tarjeta de código de barras)</td><td>Parámetros específicos de la prueba.</td></tr>
</table>

MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS

1. Simplexa™ BKV Quantitation Standard Set (REF MOL2310)
2. Equipo Integrated Cycler 3M con *software* Integrated Cycler Studio versión 3,0 o superior
3. Universal Discs para el equipo Integrated Cycler
4. Cinta de cubierta para Universal Discs
5. [a] Sistema MagNA Pure LC de Roche y elementos fungibles asociados.
6. [a] Roche MagNA Pure LC Total Nucleic Acid Isolation Kit (N.º de cat. de Roche 3038505001)
7. [b] Equipo NucliSENS® easyMAG™ de bioMérieux y consumibles y reactivos asociados
8. [b] Pipeta multicanal Biohit/bioMérieux
9. [b] Placa de tiras ELISA
10. Micropipeta(s), de canal único, multicanal y/o de repetición, de una precisión comprendida en el rango de 1-10 µl, 10-100 µl y 100-1000 µl.
11. Congelador (eliminación de escarcha manual) de -10 a -30 ºC (para guardar congelados los componentes del kit)
12. Congelador (eliminación de escarcha manual) de -10 a -30 ºC (para guardar congeladas las muestras)
13. Frigorífico de 2 °C a 8 °C (para las muestras y los componentes del kit que han sido descongelados)
14. Cabina de bioseguridad (campana de flujo laminar) para las extracciones
15. Microcentrífuga
16. Mezclador vórtex
17. Puntas de micropipetas, estériles, desechables, exentas de ARNasas/ADNasas, con protección contra aerosoles
18. Tubos para microcentrífuga de polipropileno de 1,5 ml y gradillas (se recomienda usar tubos exentos de ARNasas/ADNasas, pero no es obligatorio).
19. Guantes sin polvo desechables
20. Agua libre de nucleasas (que se utiliza durante la extracción y como el control sin molde (No Template Control (NTC))
21. Gradillas frías para los tubos de microcentrífuga de 1,5 ml

[a.] Para uso con el método de extracción Roche MagNA Pure LC
[b] Para uso con el método de extracción del bioMérieux easyMAG

PERÍODO DE VALIDEZ Y MANIPULACIÓN

1. Conserve los reactivos a una temperatura entre -10 ºC y -30 ºC (no use un congelador de tipo "no-frost").
2. Deje que los reactivos se descongelen a temperatura ambiente antes de usarlos (aproximadamente entre 18 y 25 ºC).
3. No use los kits ni los reactivos después de la fecha de caducidad.
4. Tras añadir la mezcla de Master, use la mezcla de reacción antes de que pase una hora. Guarde la mezcla de reacción a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C hasta que esté listo para proceder con la PCR.
5. Una vez descongelados, guarde la mezcla de cebadores, la mezcla maestra y el control de extracción y amplificación de ADN a una temperatura de 2 ºC a 8 ºC durante no más de 30 días..

6. No vuelva a congelar la mezcla de cebadores, la mezcla maestra, el ADN para control de extracción y amplificación ni el control positivo.
7. No combine los reactivos de distintos lotes.

ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES

1. Para utilización en el diagnóstico *in vitro.*
2. Todo el material utilizado que sea de origen humano debe ser tratado como potencialmente infeccioso. La materia prima utilizada para la fabricación de los componentes (incluyendo los controles) ha sido analizada con métodos aprobados por el FDA con resultados negativos, a la presencia de antígenos de superficie de hepatitis B, anticuerpos de hepatitis C y de VIH-1/2 (SIDA). Sin embargo, como ningún método de ensayo conocido puede ofrecer 100% de garantía de que los productos derivados de la sangre humana no transmitirán estos u otros agentes infecciosos, todos los controles, muestras de suero y equipos que entren en contacto con estas muestras deben considerarse potencialmente infecciosos y descontaminarse o eliminarse con las precauciones adecuadas de riesgo biológico. El CDC y los institutos nacionales de la salud recomiendan que los agentes potencialmente infecciosos estén manejados en el nivel 2 de Biosafety[11,12].
3. Cuando manipule los reactivos del kit, use equipos de protección personal, como guantes y batas de laboratorio, entre otros. Lávese las manos minuciosamente cuando termine de realizar la prueba.
4. No pipetee con la boca.
5. No fume, beba, coma, manipule lentes de contacto ni se aplique maquillaje en las zonas en las que se usan los reactivos del kit o muestras de origen humano.
6. Elimine los reactivos del kit que no se hayan usado y las muestras humanas según las normas locales, estatales y federales.
7. El flujo de trabajo en el laboratorio debe proceder en una sola dirección, comenzando en las zonas de preamplificación y prosiguiendo en la zona de amplificación/detección: a continuación se muestra la secuencia de acontecimientos desde la extracción de la muestra hasta la amplificación de PCR en tiempo real:
   - Empiece por la extracción de la muestra, continúe con la configuración del equipo de PCR en tiempo real, la preparación del reactivo y finalice con la amplificación mediante PCR en tiempo real.
   - No use materiales fungibles ni equipos en las áreas destinadas a la extracción y preparación de muestras. No se recomienda ningún tipo de movimiento cruzado entre las diferentes áreas.
   - Los materiales fungibles y el equipo usado para la preparación de las muestras no debe usarse para la preparación de reactivos ni para procesar el ADN amplificado ni otras fuentes de ácido nucleico diana.
   - Los materiales fungibles de amplificación y los equipos deben estar siempre en el área de equipos de PCR en tiempo real.
   - El equipo de protección personal, así como las batas de laboratorio o los guantes desechables, deben ser específicos de cada área.
8. La contaminación de las muestras de pacientes o de reactivos puede dar lugar a resultados erróneos. Utilice técnicas asépticas.
9. Pipetee y manipule los reactivos con cuidado para evitar que se mezclen con muestras de pocillos adyacentes.
10. Utilice técnicas de pipeteo adecuadas y mantenga las mismas condiciones de pipeteo durante todo el procedimiento para garantizar valores óptimos y reproducibles.
11. No sustituya los reactivos ni los mezcle con reactivos procedentes de diferentes lotes de kits o de otros fabricantes.
12. No intercambie las tapas de los tubos de reactivos. Ello puede provocar su contaminación y alterar los resultados de la prueba.
13. Use únicamente el protocolo descrito en este prospecto. Las desviaciones del protocolo o el uso de tiempos o temperaturas diferentes de las especificadas puede producir resultados erróneos.
14. La preparación de la prueba debe realizarse a temperatura ambiente (aproximadamente en el rango de 18 a 25 ºC). Cuando mezcle los reactivos, mantenga frías las enzimas mediante un bloque refrigerador.
15. No reutilice los Universal Discs que ya han estado expuestos a muestras de pacientes o reactivos.
16. Deseche el disco usado sin separar ni retirar la cinta de cubierta.
17. Si se preparan en el mismo disco diferentes kits o lotes Simplexa™, en la prueba se deberán usar los controles positivos y negativos correspondientes a cada kit.
18. La mezcla maestra contiene más de un 1% de glicerol, lo que puede causar irritación si se inhala o entra en contacto con la piel. En caso de inhalación o contacto, deben tomarse medidas de primeros auxilios.
19. No se recomienda almacenar las muestras extraídas a temperaturas entre 2 ºC a 8 ºC de forma prolongada puesto que el rendimiento no se ha establecido.
20. Si el envase del kit o su contenido tienen aspecto de estar rotos o deteriorados, no los use y póngase en contacto con Focus Diagnostics. La información de contacto aparece en la última página de este documento

INSTRUCCIONES DE USO

A. RECOGIDA DE MUESTRAS

Los tipos de muestras aceptables son orina y plasma. Para plasma, no utilice tubos recolectores de muestra que contengan heparina como anticoagulante. La heparina inhibe la PCR.

B. ÁREA DE EXTRACCIÓN DE MUESTRAS

Realice la extracción de muestras y controles en un área exclusiva para ello. La preparación de muestras para la extracción debe realizarse en una cabina de bioseguridad.

Extracción mediante el método Roche MagNA Pure LC

1. Los ácidos nucleicos se extraen de las muestras de los pacientes y de los controles de la prueba mediante el kit Roche MagNA Pure Total Nucleic Acid y el equipo Roche MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid Extractor. Consulte las instrucciones de uso del fabricante para extraer ácidos nucleicos con este kit.
2. En el menú desplegable Protocol [Protocolo] del equipo MagNA Pure LC, seleccione «Total NA» [Ácido nucleico total] y luego «Total NA Variable_elution_volume.blk». Se cargarán los ajustes apropiados para el proceso.
3. El Sample Protocol [Protocolo de la muestra] debe ser «Total NA Variable_elution_volume».
4. El volumen de la muestra debe ajustarse en 200 µl y el volumen de elución en 50 µl.
5. El volumen de dilución debe ajustarse a cero para todas las muestras.
6. Asegúrese de que el protocolo tras la elución se sitúa en None [Ninguno].
7. Asegúrese de que las muestras y los controles están en la posición correcta en el cartucho de muestras.
8. Mezcle cada muestra, control positivo bajo (LPC) y control negativo alto (HPC) en el mezclador vórtex durante 2 a 4 segundos y centrifugue brevemente para que el contenido baje al fondo del tubo.
9. Pipetee 200 µl de cada muestra, del control sin molde (NTC), control positivo bajo (LPC) y del control positivo alto (HPC) en la posición correspondiente del cartucho de muestras.
10. Inspeccione visualmente el nivel de las muestras y los controles en el cartucho de muestras para asegurarse de que se haya agregado la muestra (o las muestras).
11. Dele un pulso en el agitador vórtex al ADN para control de extracción y amplificación (CI) 2 veces y centrifugue brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
12. Por cada conjunto de 16 muestras (muestras 1-16), pipetee 100 µl del ADN del CI en 6 ml del amortiguador de lisis en un tubo de fondo cónico. Mezcle con el agitador vórtex brevemente. Añada a la bandeja apropiada del sistema de extracción MagNA Pure.
    - Por ejemplo, si se extraen más de 16 muestras (17-32 muestras), pipetee 200 µl del CI en 12 ml del amortiguador de lisis en un tubo de fondo conuco. Mezcle con el agitador vórtex brevemente. Añada a la bandeja apropiada del sistema de extracción MagNA Pure.
13. Transfiera el cartucho de muestras con las muestras al extractor MagNA Pure LC Automated Nucleic Acid e inicie el proceso de extracción.
14. Después de completar la extracción de ácido nucleico, se puede retirar el cartucho que contiene los controles extraídos y las muestras de paciente del MagNA Pure y sellarse. Guarde el ADN extraído a una temperatura de entre 2 ºC y 8 ºC antes de usarlo. No se recomienda el almacenamiento prolongado a esta temperatura de las muestras extraídas. Mantenga las muestras de ADN extraído en un bloque refrigerador mientras carga el disco.

Extracción mediante el método NucliSENS® easyMAG™ de bioMérieux.

1. Consulte el manual de usuario del equipo NucliSENS® easyMAG™ para ver el funcionamiento del equipo y del software.
2. Elija la plantilla Generic [Genérica] en el software NucliSENS® easyMAG™ con los siguientes parámetros:
   Default Request [Solicitud por defecto]: Generic 2.0.1 (o equivalente)
   Run Name Prefix [Prefijo del nombre del proceso]: (según corresponda)
   Sample ID prefix [Prefijo de ID de muestra]: (según corresponda)
   Sample Type [Tipo de muestra]: Primary [Primaria]
   Workflow Defaults [Flujo de trabajo predeterminado]: On-board lysis Incubation [incubación de lisis en placa]
   On-board Silica Incubation [incubación de sílice en placa]
   Sample Addition Guidance Off [Guía de adición de muestras apagada]
   Reagent Tracking [Seguimiento de reactivos]: Seguimiento de reactivos de lisis, sílice y control interno desactivado
3. Introduzca la información individual de cada muestra en la pantalla Extraction Request [Solicitud de extracción] tal y como se indica a continuación.
   Sample ID [Identificación de las muestras]: (introduzca el nombre de la muestra)
   Request [Solicitud]: Generic 2.0.1 (o equivalente)
   Volume (ml) [Volumen en ml]: 0,200
   Eluate (µl) [Eluato en µl]: 50
   Type [Tipo]: Primary [Primaria]
   Priority [Prioridad]: Normal
   Matrix [Matriz]: Other [Otra]
4. Inicie un proceso de extracción en el software NucliSENS® easyMAG™ siguiendo el manual de usuario.
5. Mezcle cada muestra, control positivo bajo (LPC) y control negativo alto (HPC) en el mezclador vórtex durante 2 a 4 segundos y centrifugue brevemente para que el contenido baje al fondo del tubo.

6. Pipetee 200 ul de la muestra, control negativo, control positivo y control sin molde (NTC) en los recipientes para muestras.
7. Dele dos (2) pulsos en el agitador vórtex al control interno (CI) y centrifugue brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
8. Pipetee 5uL del CI en cada muestra y en todos los pocillos de control. Cambie las puntas entre pocillos.
9. Cargue los recipientes de las muestras, los nuevos desechables del aspirador y los reactivos en el extractor easyMAG™ siguiendo el manual del usuario.
10. Inicie la lisis en la placa e incube las muestras lisadas durante 10 minutos antes de añadir la mezcla de sílice magnética.
11. Durante el periodo de incubación de lisis, prepare la mezcla de sílice magnética. Mezcle la sílice y dilúyala en agua sin nucleasas añadiendo 1 parte de sílice magnética a 3 partes de agua sin nucleasas (p. ej., 270 µl de sílice magnética + 810 µl de agua sin nucleasas). Prepare un mínimo de 135 µl de mezcla de sílice magnética por muestra.
12. Para transferir la mezcla de sílice a los pocillos de las tiras ELISA, mezcle la mezcla de sílice magnética y use 1 punta, hágalo con el modo P2 de la pipeta Biohit. Pulse **Start [Iniciar]** para aspirar 1050 µl de mezcla de sílice magnética y pulse otra vez **Start** (Iniciar) para dispensar la primera administración en el tubo de mezcla de sílice. Pulse **Start [Iniciar]** para dispensar 125 µl de la mezcla de sílice magnética en 8 pocillos individuales de la tira ELISA. Repita la operación según el número de tiras ELISA adicionales.
13. Después del periodo de incubación de lisis de 10 minutos, use 8 puntas (por cada tira ELISA) y utilizando el modo P3 de la pipeta Biohit transfiera100 µl de la mezcla de sílice magnética a cada muestra del recipiente para muestras. Coloque las puntas en los pocillos de la tira ELISA y pulse **Start [Iniciar]** para mezclar y aspirar la mezcla de sílice magnética.
14. Transfiera la mezcla de sílice magnética al recipiente para muestras apropiado y coloque las puntas de la pipeta en las muestras, por debajo del nivel del líquido. Pulse **Start [Iniciar]** para aspirar, dispensar y mezclar (x3) la sílice magnética y las muestras. Asegúrese de que las puntas están bajo el nivel del líquido para garantizar una mezcla adecuada.
15. Repita los pasos 13 y 14 para el resto de recipientes para muestras adicionales.
16. Después de añadir la mezcla de sílice magnética a todos los recipientes para muestras, inicie el proceso de extracción.
17. Cuando el proceso haya terminado, retire los recipientes para muestras del equipo. Si las muestras no se van a utilizar inmediatamente, transfiera el contenido a tubos individuales para minimizar la probabilidad de que la sílice magnética vuelva a caer en la muestra. Guarde el ADN extraído a una temperatura de entre 2 ºC y 8 ºC antes de usarlo. No se recomienda el almacenamiento prolongado a esta temperatura de las muestras extraídas. Mantenga el ADN extraído en un bloque refrigerador mientras carga el disco.

C. CONFIGURACIÓN DEL EQUIPO DE PCR EN TIEMPO REAL

1. Consulte el manual del operador del equipo Integrated Cycler para configurar el software Integrated Cycler Studio para añadir una definición de ensayo, configurar los procesos y analizarlos en el equipo Integrated Cycler.

Nota: Debe establecerse una curva estándar válida (proceso de calibración) antes de llevar a cabo un proceso de diagnóstico.

D. ZONA DE PREPARACIÓN DE REACTIVOS

Área específica para la preparación de la mezcla de reacción de la prueba Simplexa™ para VBK.

1. Descongele la mezcla de cebadores y la mezcla maestra a temperatura ambiente (aproximadamente a una temperatura entre 18 ºC y 25 ºC). Cada vial del componente del kit contiene reactivos suficientes para 50 reacciones. Antes de cada uso, mezcle suavemente la mezcla de cebadores y la mezcla maestra invirtiéndolas de 6 a 8 veces y centrifugándolas brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
2. Prepare el volumen requerido de la mezcla de reacción en un tubo para microcentrífuga de polipropileno del tamaño adecuado pipeteando el volumen de cada componente como se indica en la tabla siguiente.

Volúmenes de la mezcla de reacción

Reactivo	Mezcla de reacción/ Volumen/ 1 reacción	Mezcla de reacción/ Volumen/ 10 reacciones
Simplexa™ Master Mix	4,0 µl	40 µl
Simplexa™ BKV Primer Mix	1,0 µl	10 µl
Volumen total	5,0 µl	50 µl

3. Mezcle suavemente la mezcla de reacción mediante inversión o pipeteando de 8 a 10 veces.
4. Centrifugue brevemente para bajar el contenido al fondo del tubo.
5. Continúe con la preparación de la PCR.
6. Use la mezcla de reacción antes de que pase una hora de la preparación. Guarde la mezcla de reacción a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C si la PCR no se llevara a cabo inmediatamente después de preparar la mezcla de reacción.

E. ZONA DE AMPLIFICACIÓN POR PCR EN TIEMPO REAL

Realice la preparación del disco universal de 96 pocillos para la prueba Simplexa™ para VBK en un área habilitada exclusivamente para ello.

Consulte el ejemplo de disposición del disco de la sección C mientras realiza lo siguiente:

1. Añada 5,0 µl de mezcla de reacción a cada pocillo.
2. Añada 5 µl del control positivo extraído al pocillo del control positivo alto (HPC) y del control positivo bajo (LPC).
3. Añada 5,0 µl de la muestra del paciente extraída al pocillo del «S» correspondiente.
4. Añada 5,0 µl de control negativo (sin molde) extraído al pocillo del «NTC».
5. Cubra el disco con cinta de cubierta para Universal Discs.
6. Abra la tapa del equipo Integrated Cycler.
7. Coloque el disco universal sellado sobre el plato.
8. Cierre la tapa suavemente.
9. Pulse sobre **Run [Proceso].**
10. Pulse sobre **Start [Iniciar].**

F. ANÁLISIS DE DATOS

1. Cuando el proceso finalice, pulse **Analyze [Analizar].**
2. Revise los colorantes uno por uno o seleccione todos los colorantes (canales) al marcar la casilla de selección de cada colorante.
3. Presione el botón de vista **Print Preview [Previa de la impresión]** (botón derecho) para examinar el resumen de los valores diagnóstico. Marque la casilla de **Include Graphs [Incluir gráficas]** para examinar las gráficas de amplificación. Para incluir de calibración asociado con el proceso de diagnóstico seleccione la casilla de **Include Calibration Result [Incluir resultado de calibración].** Avance por las páginas mediante los botones con flecha que se encuentran en la esquina superior izquierda de la ventana Print Preview [Imprimir vista previa].
4. Print [Imprima] o Save [Guarde] el informe.
5. Exporte los valores diagnóstico si es necesario.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe establecer sus propios rangos de control de calidad y la frecuencia de la pruebas de control de calidad basándose en las leyes y normas locales aplicables y las buenas prácticas de laboratorio.

INFORME DE LOS RESULTADOS

1. Validez de la ronda

Determine si el proceso es válido al examinar los resultados del VBK y el control interno (CI) para el control positivo bajo (LPC), control positivo alto (HPC) y el control sin molde (NTC). Los tres controles deben reunir los criterios de aceptación para que un proceso sea válido. Si uno de los proceso resulta inválido, todas las muestras de los pacientes deben ser examinadas nuevamente.

Criterios de aceptabilidad

Control	VBK	Control de extracción y amplificación de ADN (CI)
No-Template Control (NTC)	No detectado	Detectado
Low Positive Control (LPC)	Dentro del valor de tolerancia de la etiqueta de lote específico.	No corresponde
High Positive Control (HPC)	Dentro del valor de tolerancia de la etiqueta de lote específico.	No corresponde

- El control sin molde (NTC) reúne los criterios de aceptación si el VBK no es detectable y el CI es detectable. La detección del VBK en el control sin molde indica que las muestras pudieron contaminarse durante el proceso.
- El control positivo bajo (LPC) reúne los criterios de aceptación si el VBK es detectable en el LPC dentro de los límites de tolerancia (tal como se indica en la etiqueta de lote específico) y el control interno (CI) debería detectarse, pero no requiere ser detectado.
- El control positivo alto (HPC) reúne los criterios de aceptación si el VEB es detectable en el HPC dentro de los límites de tolerancia (tal como se indica en la etiqueta de lote específico) y el control interno (CI) debería detectarse, pero no requiere ser detectado.

2. Interpretación de los resultados

Interpretación de los resultados

Ejemplo	Valor de VBK	Valor de CI	Interpretación
1	No detectado	Detectado	VBK No detectado
2	< 510 copias/ml	N/C	VBK detectado por debajo del LLoQ (Lower Limit of Quantitation)
3	X copias/ml	N/C	VBK detectado a una concentración específica.
4	> 1 x 10^8 copias/ml	N/C	VBK detectado sobre el ULoQ (Upper Limit of Quantitation).
5	No detectado	No detectado	Inválido, vuelva a extraer y repita.

3. Validez del resultado de la muestra

Una muestra es válida si

1. El VBK no es detectado y el CI es detectado.
2. El VBK es detectado. El CI no requiere ser detectado para resultados positivos de VBK.
3. Se deben examinar las curvas de amplificación para cada resultado, en especial cuando se notifica un mensaje de "Data Quality" ("Calidad de datos"). Una curva de amplificación válida presenta un aumento exponencial progresivo. Consulte el manual del usuario para obtener más recomendaciones.

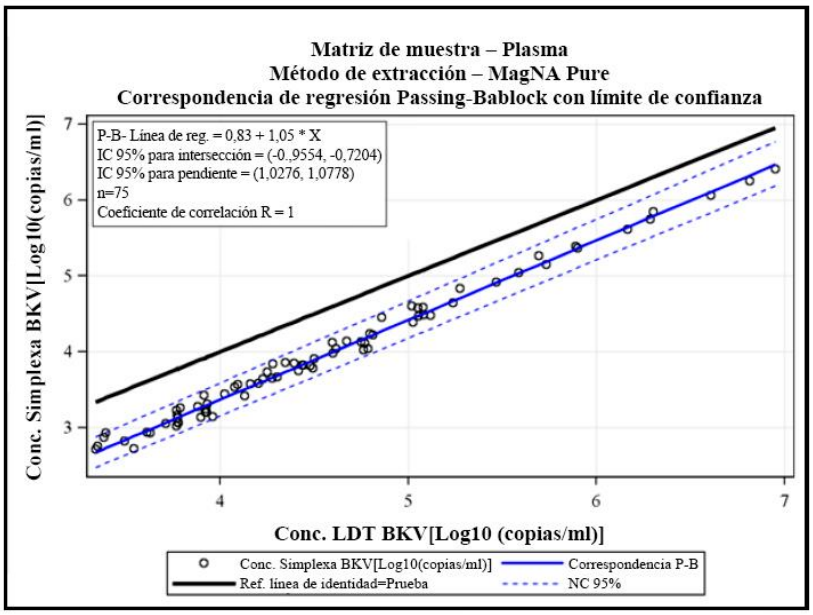
LIMITACIONES

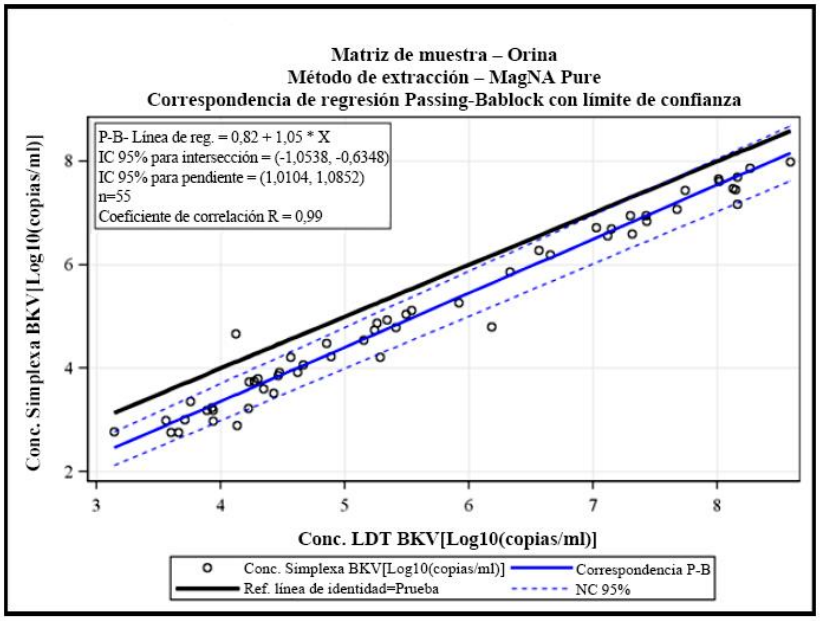
1. Los analistas deben tener una buena formación y estar familiarizados con los procedimientos de las pruebas y la interpretación de los resultados antes de realizar la prueba.
2. El 3M Integrated Cycler Studio conserva el último archivo de calibración válido para cuantificar muestras de pacientes desconocidas. Las normas de cuantificación y las muestras de los pacientes deben extraerse utilizando la misma metodología de extracción o usted recibirá resultados erróneos.
3. Cuando se realiza el seguimiento de un paciente, el método de extracción utilizado para realizar la determinación inicial en la muestra, **debe** ser utilizado en todas las determinaciones posteriores.
4. Todos los resultados de esta prueba o de cualquier otra prueba deben correlacionarse con los antecedentes clínicos, los datos epidemiológicos y otros datos disponibles para el médico a cargo de la evaluación del paciente.
5. La prevalencia de la infección influirá en el valor diagnóstico de la prueba.
6. Como ocurre con otras pruebas, los resultados negativos no descartan una infección por VBK.
7. Pueden producirse resultados falsos negativos cuando el organismo causante de la infección tiene mutaciones genómicas, inserciones, deleciones o reorganizaciones o cuando las pruebas se realizan en una fase muy temprana de la enfermedad.
8. Pueden aparecer resultados falsos negativos si en la muestra hay un número inadecuado de microorganismos debido a una recogida, un transporte o una manipulación incorrectos.
9. Al igual que con cualquier otra prueba, pueden producirse resultados falso positivos. En algunas circunstancias, podría estar indicada la repetición de la prueba o la realización de una prueba con un dispositivo diferente.
10. Esta prueba no permite descartar enfermedades causadas por otros agentes patógenos bacterianos o virales.
11. No se ha determinado el rendimiento de esta prueba en programas de diagnóstico precoz de orina o plasma para la detección de VBK.
12. Esta prueba no está indicada para su uso en programas de diagnóstico precoz o diagnóstico en orina o plasma para la detección de VBK.
13. No se ha determinado el rendimiento de esta prueba con sustancias endógenas o exógenas que puedan interferir.

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

COMPARACIÓN DE MÉTODOS

En el estudio de acuerdo clínico participó un centro de pruebas interno. Los resultados utilizados como referencias se obtuvieron utilizando una prueba desarrollada en el laboratorio (LDT, Laboratory Developed Test) de alto rendimiento. En el estudio se analizaron 150 muestras de plasma y 125 muestras de orina para la detección o cuantificación del VBK. La extracción de las muestras se llevo a cabo utilizando el método de extracción MagNA Pure. Las muestras incluidas en el análisis (75 de plasma y 55 de orina) se encontraban dentro del intervalo de combinación notificable del LDT de referencia y del ensayo Simplexa para VBK. El método de regresión Passing-Bablok arrojó una pendiente de 1,05 y una intersección de -0,83 para plasma y una pendiente de 1,05 y una intersección de -0,82 para orina.


Matriz de muestra – Plasma
Método de extracción – MagNA Pure
Correspondencia de regresión Passing-Bablock con límite de confianza
P-B- Línea de reg. = 0,83 + 1,05 * X
IC 95% para intersección = (-0,,9554, -0,7204)
IC 95% para pendiente = (1,0276, 1,0778)
n=75
Coeficiente de correlación R = 1
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Conc. LDT BKV[Log10 (copias/ml)]
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Correspondencia P-B
Ref. línea de identidad=Prueba
NC 95%


Matriz de muestra – Orina
Método de extracción – MagNA Pure
Correspondencia de regresión Passing-Bablock con límite de confianza
P-B- Línea de reg. = 0,82 + 1,05 * X
IC 95% para intersección = (-1,0538, -0,6348)
IC 95% para pendiente = (1,0104, 1,0852)
n=55
Coeficiente de correlación R = 0,99
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Conc. LDT BKV[Log10(copias/ml)]
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Correspondencia P-B
Ref. línea de identidad=Prueba
NC 95%

Las muestras clínicas con los resultados de rango lineal del ensayo Simplexa para VBK también se analizaron con extracción easyMAG. Las muestras se comportaron de modo equivalente a las muestras extraídas con una extracción MagNA Pure (pendiente de 0,98 y una intersección de -0,03 para plasma y una pendiente de 1,06 y una intersección de -0,4 para orina).

SENSIBILIDAD ANALÍTICA/LÍMITE DE DETECCIÓN

El límite de detección (LoD, Limit of Detection) se calculó creando muestras diseñadas partir de un stock de una cepa de VBK cuantificada que se agregó a matrices de plasma y orina clínicamente negativas. La batería incluyó matrices de orina y plasma negativas (sin agregados) y muestras de concentraciones variables, diluidas en serie, aproximadamente al LoD (obtenido en una fase de la prueba anterior). Para cada combinación de sistema de extracción (easyMAG, MagNA Pure) y tipo de muestra (plasma, orina) se analizaron veinticuatro (24) réplicas procedentes de tres (3) extracciones diferentes y fases de PCR a cada nivel con el Probit Analysis para determinar la concentración más baja que pudiera ser detectada con una probabilidad del 95%. El protocolo LoD se realizó para cada uno de los dos métodos de extracción y tipos de muestras. Los valores LoD individuales se muestran en la tabla siguiente. Se determinó que el LoD era de 510 copias/ml, basado en el LoD mayor observado en todos los métodos de extracción y tipos de muestras.

	Plasma		Orina	
	MagNA Pure	**easyMag**	**MagNA Pure**	**easyMag**
Copias/ml	**510**	**385**	**503**	**253**

REACTIVIDAD ANALÍTICA/REACTIVIDAD CRUZADA

Los estudios han indicado que los cebadores son específicos para VBK y que no poseen reacción cruzada con otros microorganismos como VIH-1, VIH-2, VHS-1, VHS-2*, VHH-6, VJA, VVZ, VEB, VCM, Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus, Candida, Enterobacter, Citrobacter, E.coli, Klebsiella y Proteus mirabilis.* Adicionalmente, las bases de datos de las secuencias de ácidos nucleicos indicaron que los cebadores eran específicos para VBK y que no poseían homología significativa con otros patógenos o con ADN humano.

INTERFERENCIAS

El rendimiento de este ensayo no ha sido evaluado con sustancias que puedan interferir potencialmente. Los procesos de extracción de ácidos nucleicos automatizados, usando el sistema MagNA Pure o el NucliSENS easyMAG eliminan eficazmente las impurezas de la muestra ya que aíslan y lavan los ácidos nucleicos durante el proceso de extracción. Los controles internos alertan al usuario final de una potencial inhibición de la PCR, si ni la diana ni los controles internos se detectan, el ensayo es inválido.

REPRODUCIBILIDAD

El estudio de reproducibilidad se llevó a cabo por dos operadores en dos termocicladores integrados (un operador por termociclador) que realizaron dos análisis de PCR al día durante cinco días. La batería de reproducibilidad contenía los controles (NTC, HPC y LPC), los patrones de cuantificación (QS-1 a QS-5), mezclas negativas (matrices de orina y plasma sin agregados) y mezclas positivas con virus VBK en matrices de orina y plasma a tres concentraciones diferentes, una mezcla baja (a la que se le agregó una concentración aproximadamente de 2 a 4 veces el límite de detección (LoD), una mezcla media (aproximadamente de 8 a 10 veces el LoD) y una mezcla alta (intervalo superior del ensayo). Se analizaron cuatro réplicas de cada muestra de la batería para un total de 80 determinaciones para cada miembro de la batería del estudio. En la tabla siguiente se muestran los resultados de reproducibilidad de cada muestra de la batería.

Reproducibilidad Simplexa para VBK									
					Desviación estándar				
Nombre de la muestra	**Concentración esperada (copias/ml)**	**Media geométrica (copias/ml)**	**Media logarítmica (copias/ml)**	**Nº. de resultados medibles***	**Entre equipos**	**Entre días**	**Entre pruebas de PCR**	**Dentro de la misma prueba de PCR**	**Total**
NTC	0	No detectado	No detectado	0	No corresponde (N/C)				
HPC	$5{,}08 \times 10^7$	$4{,}81 \times 10^7$	7,682	74	0,026	0,012	0,025	0,024	0,045
LPC	$6{,}32 \times 10^3$	$6{,}44 \times 10^3$	3,809	80	0,014	0,034	0,015	0,045	0,060
QS-1	$4{,}70 \times 10^8$	$>1 \times 10^8$	N/A	0	N/C				
QS-2	$5{,}29 \times 10^6$	$5{,}35 \times 10^6$	6,728	79	0,016	0,021	0,024	0,024	0,043
QS-3	$2{,}74 \times 10^4$	$5{,}56 \times 10^4$	4,745	80	0,000	0,021	0,014	0,021	0,032
QS-4	$5{,}83 \times 10^3$	$5{,}89 \times 10^3$	3,770	80	0,005	0,025	0,017	0,047	0,056
QS-5	$1{,}05 \times 10^3$	$1{,}02 \times 10^3$	3,007	80	0,008	0,031	0,000	0,083	0,089
	Plasma								
Mezcla alta	$1{,}00 \times 10^7$	$9{,}11 \times 10^6$	6,960	74	0,016	0,009	0,026	0,019	0,037
Mezcla media	$5{,}00 \times 10^3$	$4{,}71 \times 10^3$	3,673	80	0,022	0,050	0,025	0,048	0,076
Mezcla baja	$2{,}00 \times 10^3$	$1{,}44 \times 10^3$	3,158	80	0,063	0,050	0,000	0,098	0,126

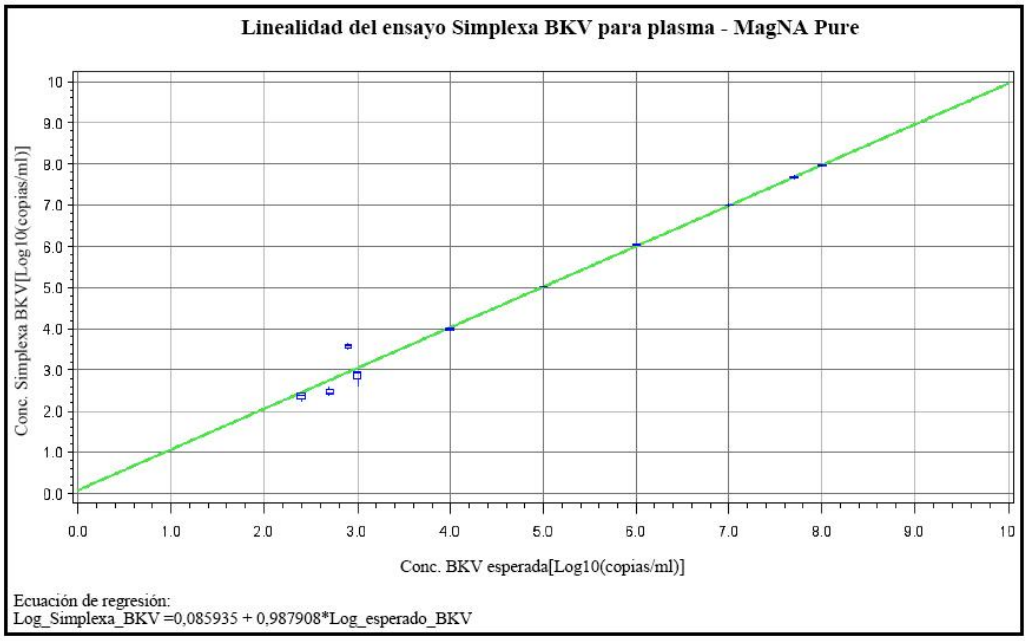
Reproducibilidad Simplexa para VBK									
					Desviación estándar				
Nombre de la muestra	**Concentración esperada (copias/ml)**	**Media geométrica (copias/ml)**	**Media logarítmica (copias/ml)**	**Nº. de resultados medibles***	**Entre equipos**	**Entre días**	**Entre pruebas de PCR**	**Dentro de la misma prueba de PCR**	**Total**
Mezcla neg.	0	No detectado	No detectado	0	N/C				
	Orina								
Mezcla alta	$1{,}00 \times 10^7$	$5{,}75 \times 10^6$	6,760	80	0,000	0,104	0,014	0,013	0,105
Mezcla media	$5{,}00 \times 10^3$	$2{,}87 \times 10^3$	3,458	80	0,000	0,061	0,022	0,081	0,104
Mezcla baja	$2{,}00 \times 10^3$	$1{,}12 \times 10^3$	3,048	79	0,088	0,049	0,000	0,090	0,135
Mezcla neg.	0	No detectado	No detectado	0	N/C				

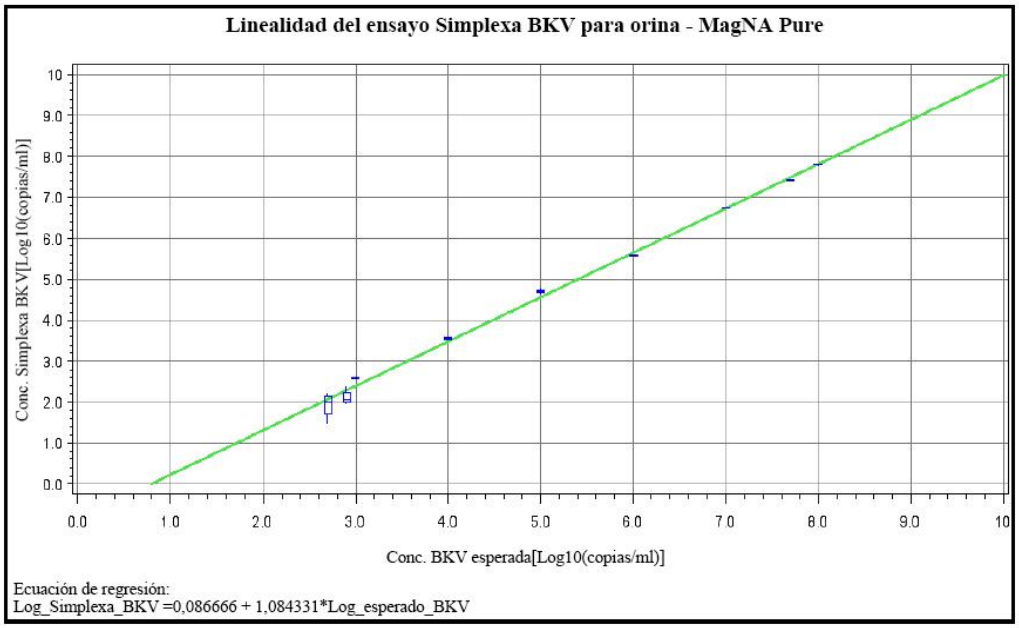
*** Número de resultados dentro del rango de linealidad del ensayo Simplexa para VBK.**

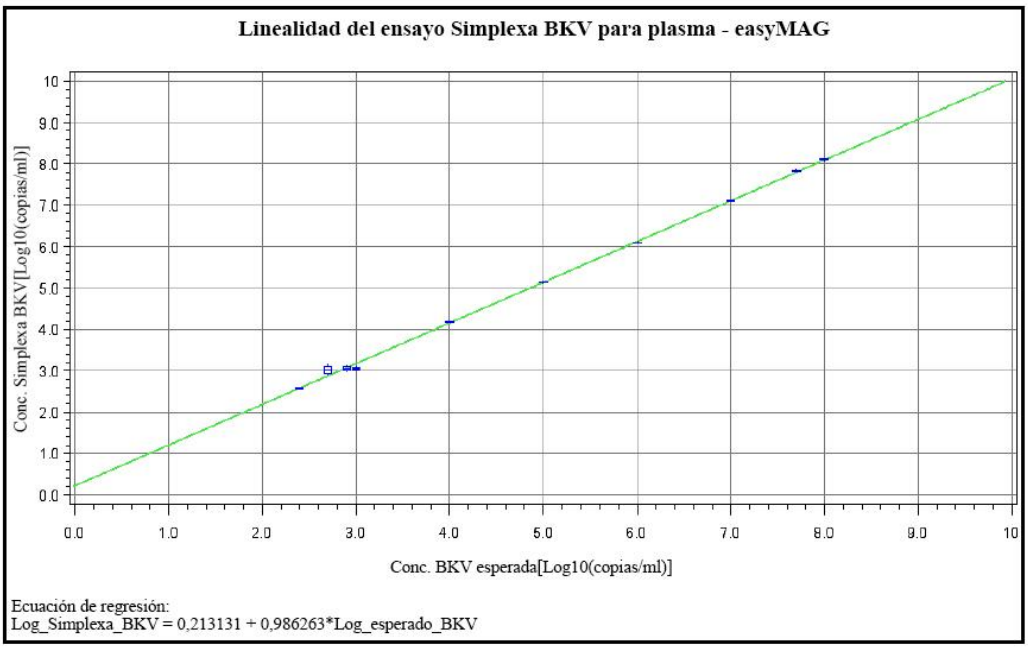
LINEALIDAD

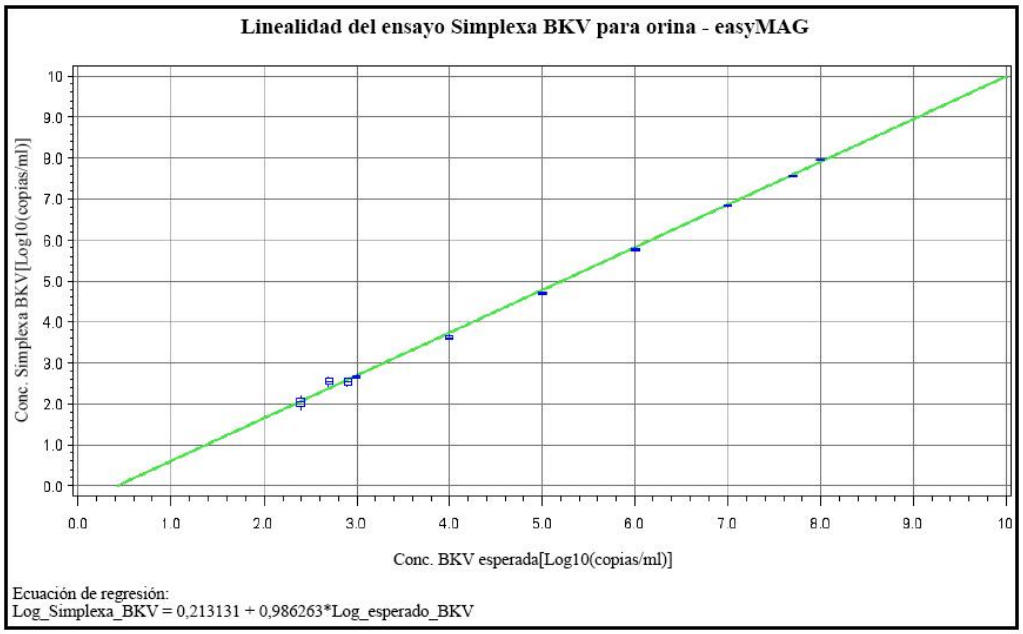
La linealidad se determinó mediante muestras diseñadas a partir de un stock de una copia de VBK cuantificada que se agregó a matrices de orina y plasma clínicamente negativas. La batería consistía en 10 mezclas de copias conocidas, a lo largo del intervalo lineal esperado. De las mezclas, al menos 3 concentraciones estaban cerca del límite inferior de cuantificación (LLOQ), 2 cerca del límite superior de cuantificación (ULOQ) y las restantes distribuidas aproximadamente a partes iguales entre el LLOQ y el ULOQ. Cada muestra se ensayó aleatoriamente, en al menos 3 réplicas. El protocolo de linealidad se realizó para cada tipo de muestra en cada uno de los dos métodos de extracción. Los valores individuales del intervalo de notificación se muestran en la tabla siguiente.

	Plasma		**Orina**	
	MagNA Pure	**easyMag**	**MagNA Pure**	**easyMag**
copias/ml	250 a $1{,}00 \times 10^8$	250 a $1{,}00 \times 10^8$	500 a $1{,}00 \times 10^8$	250 a $1{,}00 \times 10^8$


Linealidad del ensayo Simplexa BKV para plasma - MagNA Pure
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Conc. BKV esperada[Log10(copias/ml)]
Ecuación de regresión:
Log_Simplexa_BKV =0,085935 + 0,987908*Log_esperado_BKV


Linealidad del ensayo Simplexa BKV para orina - MagNA Pure
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Conc. BKV esperada[Log10(copias/ml)]
Ecuación de regresión:
Log_Simplexa_BKV =0,086666 + 1,084331*Log_esperado_BKV


Linealidad del ensayo Simplexa BKV para plasma - easyMAG
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Conc. BKV esperada[Log10(copias/ml)]
Ecuación de regresión:
Log_Simplexa_BKV = 0,213131 + 0,986263*Log_esperado_BKV


Linealidad del ensayo Simplexa BKV para orina - easyMAG
Conc. Simplexa BKV[Log10(copias/ml)]
Conc. BKV esperada[Log10(copias/ml)]
Ecuación de regresión:
Log_Simplexa_BKV = 0,213131 + 0,986263*Log_esperado_BKV

RANGO DE INFORME

Todos los métodos de extraccción y los tipos de muestras fueron lineales hasta 1×10^8 copias/ml. El intervalo de notificación del ensayo se basó en el LoD, ya que era mayor que la linealidad. Esto se determinó como $\geq$ 510 copias/ml a $\leq 1 \times 10^8$ copias/ml. Las muestras mayores que el rango lineal se describirán como $>1 \times 10^8$ copias/ml y las muestras inferiores a 510 se describirán como <510.

CONTAMINACIÓN POR TRANSFERENCIA

Se evaluó la amplificación por arrastre para el equipo y el Disco Universal utilizando otros ensayos. Los estudios se centraron en la búsqueda de contaminación en muestras altamente negativas. El estudio se diseñó colocando de manera alterna muestras con resultado positivo alto y resultado negativo alto en cada disco. El efecto de arrastre se evaluó comparando la tasa de

negativos observados en las muestras con resultado negativo alto con la tasa esperada en condiciones de reproducibilidad normales. No se observó contaminación por efecto de arrastre en pruebas anteriores.

REFERENCIAS

1. Padgett, B.L. and Walker, D.L. (1973). "Prevalence of antibodies in human sera against JC virus, an isolate from a case of progressive multifocal leukoencephalopathy". *J. Infect. Dis.* **127** (4): 467-470.
2. Shah KV, Daniel RW, Warszawski RM. High prevalence of antibodies to BK virus, an SV40-related papovavirus, in residents of Maryland. J Infect Dis 1973; 128:784.
3. Gardner SD. Prevalence in England of antibody to human polyomavirus (B.K.). BMJ 1973; 1:77.
4. Mantyjarvi RA, Meurman OH, Vihma L, Berglund B. A human papovavirus (BK), biological properties and seroepidemiology. Ann Clin Res 1973; 5:283.
5. Flaegstad T, Ronne K, Filipe AR, Traavik T. Prevalence of anti BK virus antibody in Portugal and Norway. Scand J Infect Dis 1989;21(2):145-7.
6. Rziha HJ; Bornkamm GW; zur Hausen H. BK virus: I. Seroepidemiologic studies and serologic response to viral infection. Med Microbiol Immunol (Berl) 1978 Jul 4;165(2):73-81.
   AU Dei R; Marmo F; Corte D; Sampietro MG; Franceschini E; Urbano P
7. Age-related changes in the prevalence of precipitating antibodies to BK virus in infants and children. J Med Microbiol 1982 Aug;15(3):285-91.
8. Arthur RR, Shah KV. Occurrence and significance of papovaviruses BK and JC in the urine. Prog Med Virol 1989; 36:42.
9. Shah, KV. Polyomaviruses. IN: Virlogy (3rd Ed), Fields, BN, Knope, DM, Howley, PM (Eds), Lipincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996. p. 2027.
10. Gillespie, SM, Chang, Y, Lemkp, G, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in persons infected with human immunodeficiency virus, San Francisco, 1981-1989. Ann Neurol 1991; 30:597.
11. NCCLS H18-A2. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline. 2nd Ed.
12. CDC-NIH Manual. (1999) Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. 4th ed. And National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of Laboratory Workers from Instruments, Biohazards and Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids and Tissue (NCCLS M29-A).

El uso de sondas Scorpions® para diagnósticos *in vitro* en seres humanos está cubierto por una licencia de Focus Diagnostics, Inc. de DxS, Ltd. Los colorantes Black Hole Quencher™, CAL Fluor™ y Quasar™ son marcas registradas de Biosearch Technologies, Inc. ('BTI'). La tecnología de los fluoróforos Black Hole Quencher, CAL Fluor y Quasar está autorizada según un acuerdo con BTI, y estos productos se venden exclusivamente con fines clínicos, diagnósticos o de investigación y desarrollo.

REPRESENTANTE AUTORIZADO
mdi Europa GmbH, Langenhagener Str. 71 30855, Langenhagen-Hannover, Alemania

PI.MOL2300.OUS.ES
Rev. E
Fecha de redacción: 10 de noviembre de 2014

INFORMACIÓN PARA PEDIDOS

Teléfono:	(800) 838-4548 (EE.UU. solamente)	(562) 240-6500 (Internacional)
Fax:	(562) 240-6510	

ASISTENCIA TÉCNICA

Teléfono:	(800) 838-4548 (EE.UU. solamente)	(562) 240-6500 (International)
Fax:	(562) 240-6526	

Visite nuestro sitio web en www.focusdx.com

Cypress, California 90630 EE.UU.